

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-102492

(43)Date of publication of application : 08.04.2003

(51)Int.Cl.

C12P 7/26  
 C07C 29/143  
 C07C 35/16  
 C12N 1/20  
 C12P 7/18  
 //C12N 1/20  
 C12R 1:38 )  
 (C12N 1/20  
 C12R 1:02 )  
 (C12P 7/18  
 C12R 1:38 )  
 (C12P 7/18  
 C12R 1:02 )  
 (C12P 7/26  
 C12R 1:38 )  
 (C12P 7/26  
 C12R 1:02 )

(21)Application number : 2002-184912

(22)Date of filing : 25.06.2002

(71)Applicant : HOKKO CHEM IND CO LTD

(72)Inventor : KANBE KENJI  
 TAKAHASHI ATSUSHI  
 KITA YUICHI  
 YAMAGUCHI MASANORI  
 TAMAMURA TAKESHI  
 MORI TETSUYA

(30)Priority

Priority number : 2001191161 Priority date : 25.06.2001 Priority country : JP

(54) METHOD OF PRODUCING SCYLLO-INOSOSE AND METHOD OF PRODUCING SCYLLO-INOSITOL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of producing scyllo-inosose that is high useful as a raw material for medicines from inexpensive myo-inositol and a method of producing scyllo-inositol by reducing scyllo-inosose chemically by using a microorganism.

SOLUTION: A microorganism, *Pseudomonas* sp. AB10064 strain (FERM P-18330) or *Acetobacter* sp. AB10253 strain (FERM P-18868), is allowed to act on myo-inositol to convert to scyllo-inosose. After scyllo-inosose is produced according to the process described, a reductant is allowed to act on the reaction mixture including scyllo-inosose without isolation of the scyllo-inosose formed to produce myo-inositol and scyllo-inositol. According to this invention, the scyllo-inosose of high purity useful as a raw material for medicines, agrochemicals and the scyllo-inositol useful as a raw material for synthesizing medicines, agrochemicals can be inexpensively produced.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 02.07.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-102492

(P2003-102492A)

(43)公開日 平成15年4月8日(2003.4.8)

(51)Int.Cl. <sup>1</sup>	識別記号	F I	マーク(参考)
C 12 P	7/26	C 12 P	4 B 0 6 4
C 07 C	29/143	C 07 C	4 B 0 6 5
	35/16		4 H 0 0 6
C 12 N	1/20	C 12 N	A
C 12 P	7/18	C 12 P	

審査請求 未請求 請求項の数11 O.L (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2002-184912(P2002-184912)	(71)出願人	000242002 北興化学工業株式会社 東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号
(22)出願日	平成14年6月25日(2002.6.25)	(72)発明者	神辺 健司 神奈川県横浜市青葉区みたけ台7番地16
(31)優先権主張番号	特願2001-191161(P2001-191161)	(72)発明者	高橋 篤 神奈川県川崎市多摩区宿河原2丁目42番25 -201号
(32)優先日	平成13年6月25日(2001.6.25)	(74)代理人	100066452 弁理士 八木田 茂 (外2名)
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 シローイノソースの製造法及びシローイノシトールの製造法

(57)【要約】

【課題】 微生物を利用して、安価なミオーイノシトールから医薬品その他の原料として利用価値の高いシローイノソースを製造する方法と、シローイノソースを化学的に還元してシローイノシトールを効率よく製造する方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明では、ミオーイノシトールにシードモナス・エスピーアB10064株 (FERM P-18330) あるいはアセトバクター・エスピーアB10253株 (FERMP-18868) を作用させて、ミオーイノシトールをシローイノソースへ変換させることを特徴とする、シローイノソースの製造方法と、上記の方法でシローイノソースを生成させた後に、生成したシローイノソースを単離することなしに、シローイノソースを含有する反応液に還元剤を作用させてシローイノシトールをおよびミオーイノシトール生成させることを特徴とするシローイノシトールの製造方法とが開発された。本発明の方法によれば、医農薬合成原料として有用な、純度の高いシローイノソースと、医薬及び医農薬合成原料として有用なシローイノシトールを、工業的生産レベルで安価に製造することがで

きる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ミオーイノシトールに、細菌であるシュードモナス・エスピーアB10064株 (FERM P-18330として寄託) あるいはアセトバクター・エスピーアB10253株 (FERM P-18868として寄託) を作用させて、ミオーイノシトールをシローイノソースへ変換させることを特徴とする、シローイノソースの製造方法。

【請求項2】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、培養液中でミオーイノシトールに該細菌を作用させて、ミオーイノシトールをシローイノソースへ変換させ、これにより、培養液中でシローイノソースを生成させかつ蓄積させ、そして、培養液からシローイノソースを回収する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、その培養液から得られた菌体或いはその破碎物を、ミオーイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオーイノシトールに作用させて前記の水溶液または緩衝液中でシローイノソースを生成させ、そして生成したシローイノソースを回収する、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 請求項1に記載の方法でシローイノソースを生成させ、得られた反応液から生成したシローイノソースを単離することなしに、シローイノソースを含有する該反応液に還元剤を添加して作用させてシローイノソースからシローイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させることを特徴とする、シローイノシトールの製造方法。

【請求項5】 請求項4に記載の方法でシローイノソースを還元してシローイノシトールとミオーイノシトールを生成させ、生成されたシローイノシトールおよびミオーイノシトールを含む反応液に、再度、AB10064株あるいはAB10253株を作用させることにより、反応液中に存在するシローイノシトールには何ら影響を与えないに、シローイノシトールと同時に生成したミオーイノシトールをシローイノソースへ変換し、得られた反応液に次に還元剤を添加してシローイノソースからシローイノシトールおよびミオーイノシトールを再び生成させることにより、反応液中のシローイノシトールの含有量を高める、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 請求項5に記載の方法でシローイノソースを還元した際に生成するミオーイノシトールを、AB10064株あるいはAB10253株で再びシローイノソースへ変換する工程を数回繰り返し実行し、得られた反応液に次に還元剤を添加して、シローイノソースからシローイノシトールを生成させることにより、反応液中のシローイノシトールの濃度を段階的に高める、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、培養液中でミオー

イノシトールに当該細菌を作用させて、ミオーイノシトールをシローイノソースに変換することにより培養液中でシローイノソースを生成させかつ蓄積させ、得られた反応液からシローイノソースを単離することなしに、シローイノソースを含有する該反応液に次に還元剤を直接に添加して、該還元剤をシローイノソースに作用させてシローイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させ、そして得られた反応液からシローイノシトールを回収する、請求項4に記載の方法。

【請求項8】 請求項7に記載の方法で、シローイノソースから還元剤でシローイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させた反応液に、再度、AB10064株あるいはAB10253株を作用させることにより反復回分で培養を実施して、反応液中に生成したミオーイノシトールをシローイノソースへ変換し、この反応液に還元剤を直接に添加して該還元剤をシローイノソースに作用させてシローイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させることにより、反応液中のシローイノシトールの含有量を高め、こうして得られた反応液中からシローイノシトールを回収する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 請求項1に記載の細菌を、ミオーイノシトールを含有する液体培地で培養し、その培養液から得られた菌体或いはその破碎物を、ミオーイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオーイノシトールと反応させて前記の水溶液または緩衝液中でシローイノソースを生成せしめ、得られた反応液から生成したシローイノソースを単離することなしに、シローイノソースを含有する該反応液に還元剤を直接に添加し、該還元剤をシローイノソースに作用させてシローイノシトールおよびミオーイノシトールを生成させ、そして生成したシローイノシトールを回収する、請求項4に記載の方法。

【請求項10】 ミオーイノシトールをシローイノソースに選択的に変換できる特性を有して独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18330の受託番号で寄託されたシュードモナス・エスピーアB10064株。

【請求項11】 ミオーイノシトールをシローイノソースに選択的に変換できる特性を有して独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18868の受託番号で寄託されたアセトバクター・エスピーアB10253株。

## 【発明の詳細な説明】

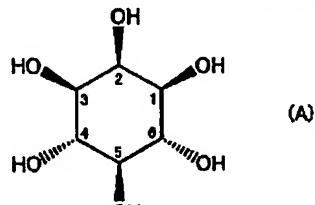
## 【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、自然界から新たに本発明者らが分離したシュードモナス属細菌AB10064株あるいはアセトバクター属細菌AB10253株を新規な微生物として利用し、安価なミオーイノシトール (myo-Inositol) から、医薬品その他の原料として利用価値の高いシローイノソース (scyllo-Inosose) を製造する方法に関する。また、本発明はミオーイノシトールから得

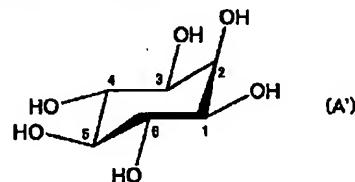
たシローアイノソースを化学的に還元して、アルツハイマー病の治療薬 (The Journal of Biological Chemistry, 第275巻No.24、第18495~18502頁、2000年) や、生理活性物質の合成原料 (米国特許第5,412,080号明細書)、液晶化合物の合成原料 (ドイツ連邦共和国公開特許第3,642,999号公報) としての用途が期待されているシローアイノシトール (scyllo-Inositol) を効率よく製造する方法にも関する。

【0002】

【従来の技術】ミオーアイノシトールは次の平面式 (A)

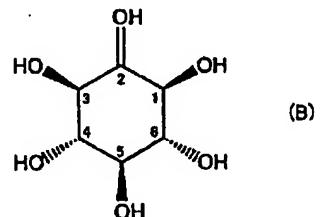


または次の立体構造式 (A')

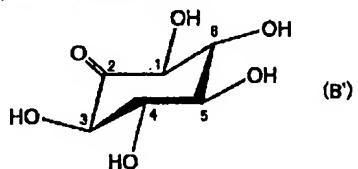


で表される天然に産する既知の物質である。

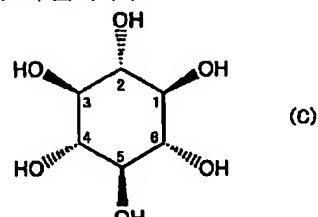
【0003】また、シローアイノソースは次の平面式 (B)



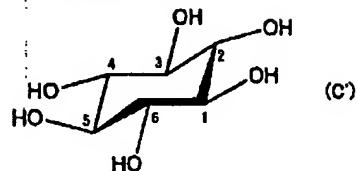
または次の立体構造式 (B')



で表される既知の化合物である。さらに、シローアイノシトールは次の平面式 (C)



または次の立体構造式 (C')



で表される既知の化合物である。

【0004】シローアイノシトールはミオーアイノシトールの立体異性体の一つで、動物・植物中に広く見出される物質である。また、シローアイノソースはミオーアイノシトールの2位のアキシャルな水酸基が酸化された構造を有する化合物でこれも天然物として普遍的に存在する。

【0005】ミオーアイノシトールを酸化してシローアイノソースへ変換する酵素 (ミオーアイノシトールデヒドロゲナーゼ) は自然界に広く存在する酵素であり、動物、藻類、酵母、細菌等、多くの生物種からのものについて報告がある。上記酵素を有する代表的な微生物種としては、グルコノバクター属細菌 (Helvetica Chimica Acta, 第24巻、第1045~1058頁、1941年及びJournal of Organic Chemistry, 第26巻、第912~918頁、1961年等)、バチルス属細菌 (特開平4-126075号公報)、シユードモナス属細菌 (Monatshefte fur Chemie, 第100巻、第1327~1337頁、1969年及びJournal of Bacteriology, 第131巻、第872~875頁、1977年) がある。なお、グルコノバクター属細菌を記載する前記のHelvetica Chimica Acta, 第24巻、第1045~1058頁 (1941年) 及びJournal of Organic Chemistry, 第26巻、第912~918頁 (1961年) 等の論文中にはAcetobacter oxydansあるいはAcetobactersuboxydansと記載されているが、これらの菌株はその後Gluconobacter属として再分類され、Barbacy's Manual of Determinative Bacteriology第8版 (1974年) から以降はGluconobacter属に移されている。

【0006】また、ミオーアイノシトールをシローアイノシトールへ変換できる微生物としてはアグロバクテリウム属細菌が知られている (特開平9-140388号公報)。

【0007】一方、化学合成的手法でシローアイノソースまたはシローアイノシトールを製造する方法としては、①ヘキサヒドロキシベンゼンをラネイニッケルで還元し、

シローアイノシトールを得る方法 (Journal of the American Chemical Society, 70巻、293頁、1948年) ; ②グルコフラノース誘導体から5段階の反応でシローアイノソースを得た後、還元して、シローアイノシトールを得る方法 (Journal of the American Chemical Society, 第90巻、第3289~3290頁、1968年) ; ③シス-トリオキサトリス-ホモベンゼンを原料に4段階以上の反応でシローアイノシトールを得る方法 (Angewandte Chemie, 第85巻、第1110~1111頁、1973年) ; ④ミオーアイノシトールを白金触媒で酸化してシローアイノソースを得、続いてエステル化した後、還元と加水分解を行って、シローアイ

シトールを得る方法（ドイツ連邦共和国公開特許第3,405,663号公報）等がある。

【0008】以上のように、ミオーアイノシトールを微生物により酸化してシローアイノソースを生成する方法、及び、シローアイノソースを適当な還元剤で還元してシローアイノシトールを生成する方法は公知の技術である。

【0009】しかしながら、これら既知のシローアイノソース及びシローアイノシトールの製造方法は、いずれも工業的規模で実施する方法としては、使用される微生物の変換活性が弱く、また操作の煩雑さ、環境汚染あるいは経済性の面で問題があるので、これらの従来法は全て必ずしも満足し得るものではない。従って、工業規模で簡便に且つ効率よくシローアイノソースを製造する方法、及びシローアイノシトールを製造する方法が要望されている。

#### 【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、高純度のシローアイノソースを効率よく製造できる新しい方法及びシローアイノシトールを効率よく製造できる新しい方法を提供することにある。

#### 【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するために銳意検討を重ねてきた。その結果、本発明者らが自然界より新たに分離した、シュードモナス属細菌と同定されてAB10064の菌株番号を付与された新菌株の細菌を、ミオーアイノシトールに作用させると、ミオーアイノシトールからシローアイノソースを選択的に高収率で生成させ得る選択的な酸化の活性をもつことを見出した。また、同様な活性が別個に分離されたアセトバクター属細菌と同定されてAB10253の菌株番号を付与された菌株にも見出された。

【0012】本発明者らの研究によれば、ミオーアイノシトールと通常の炭素源及び窒素源とを含有する液体培地、あるいは通常の炭素源を特に含有しないでミオーアイノシトールと窒素源とを含有する液体培地で上記のシュードモナス・エスピーブーAB10064株あるいはアセトバクター・エスピーブーAB10253株を好気的に培養して、これにより得られた培養液中で、ミオーアイノシトールからシローアイノソースを生成させ且つシローアイノソースを高い含有量で蓄積させるようにしてシローアイノソースの新しい製造法を本発明で実施できる。また、本発明のシローアイノソースの新しい製造方法では、培養液中にまたは水性媒質中に高い含有量で蓄積したシローアイノソースは、これに何ら化学的処理を施さずに、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂等を使用するイオン交換樹脂処理あるいは活性炭処理あるいは晶析操作にかけることにより、あるいはこれらの処理の組合せにかけることにより、高純度なシローアイノソースとして、効率よく回収するようにして実施できる。

【0013】さらに、本発明者らが別途の研究を行った

結果、上記の培養液中に蓄積されたシローアイノソースは、培養液から菌体を除去した後、得られた培養上清液に直接、適当な量の水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤を添加して、培養上清液中で上記シローアイノソースに該還元剤を反応させた場合には、シローアイノソースはシローアイノシトールに効率よく還元されること、およびミオーアイノシトールが副生されることが知見された。すなわち、培養上清液中のシローアイノソースは、該上清液から単離されなくとも、上記還元剤との反応により培養上清液内でシローアイノシトールに効率よく還元され得ることが見出された。また、このとき、シローアイノシトールの生成と同時にミオーアイノシトールも副成することが見出された。こうして得られた還元反応液に対して、還元反応前に培養液から除去したAB10064株の菌体あるいはAB10253株を再度添加し、酵母エキス等の適当な栄養源と共に反復回分培養を実施すると、還元反応液中のシローアイノシトールには全く影響を与えずに、副成したミオーアイノシトールのみをシローアイノソースへ変換する酸化反応が進行することが判明した。更に、この酸化の反応液

（培養液）から除菌し、さらにその培養上清液に再度、還元剤を添加し、シローアイノソースを還元すると、ここで得られた還元反応液中のシローアイノシトールの含量が増大し、従って、このように行われた方法は効率的なシローアイノシトールの製造方法として非常に有効な手段であることを知見した。この微生物的酸化反応と化学的還元反応は、繰り返し実施することで更に反応液または培養液（または培養上清液）中のシローアイノシトールの含有量を増大させることができることも知見した。

【0014】従って、第1の本発明においては、ミオーアイノシトールに、細菌であるシュードモナス・エスピーブーAB10064株（FERM P-18330として寄託）あるいはアセトバクター・エスピーブーAB10253株（FERM P-18868として寄託）を作用させて、ミオーアイノシトールをシローアイノソースへ変換させることを特徴とする、シローアイノソースの製造方法が提供される。

【0015】適当な精製方法、例えばイオン交換樹脂処理、あるいは晶析等あるいはこれらの組合せにかけることにより、上記の方法で得られた反応液または培養上清液から効率よくシローアイノソースを回収することができる。

【0016】第1の本発明の方法は、具体的には以下に示す（A）及び（B）の2つの実施方法で行うことができる。

【0017】実施方法（A）では、ミオーアイノシトール並びに炭素源及び窒素源を含有する液体培地に、AB10064株あるいはAB10253株を接種して好気的に培養し、得られた培養液中で該細菌をミオーアイノシトールに作用させて、ミオーアイノシトールをシローアイノソースへ変換させ、これにより培養液中でシローアイノソースを生成させかつ蓄積させ、そして培養液から菌体を除き、得られた

培養上清液で例えればイオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せを行うことにより、培養上清液からシローイノソースを回収する。

【0018】実施方法(B)は、上記AB10064株あるいはAB10253株をミオーアイノシトールを含有する液体培地で培養し、その培養液から菌体を除き、ここで得られた菌体或いはその破碎物を、ミオーアイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオーアイノシトールに作用させて前記の水溶液または緩衝液中でシローイノソースを生成せしめ、そして、生成したシローイノソースを例えればイオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せにより回収する。

【0019】以下においては、第1の本発明の方法の実施方法(A)及び(B)をより詳しく説明する。実施方法(A)では、ミオーアイノシトールならびに炭素源及び窒素源を含む液体栄養培地に、AB10064株あるいはAB10253株を接種して好気的に培養することにより、ミオーアイノシトールからシローイノソースを生成させ、蓄積せらる。

【0020】用いる液体培地の組成は、目的を達成し得る限り何ら特別の制限はなく、シローイノソースへの変換原料であるミオーアイノシトールを含有しかつ更に炭素源、窒素源、有機栄養源、無機塩類等を含有する培地であればよい。合成培地、天然培地のいずれも使用できる。液体培地はミオーアイノシトールを0.1%～40%、より好ましくは10%～30%含有し、炭素源として、グリセロール、ショークロース、マルトースあるいは澱粉を0%～20%、より好ましくは0%～5%含有し、窒素源として、酵母エキス、ペプトン、カザミノ酸、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウムあるいは尿素等を0.01%～5.0%、好ましくは0.5%～2.0%含有することが望ましい。その他必要に応じ、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、マンガン、亜鉛、鉄、銅、モリブデン、リン酸、硫酸などのイオンを生成することができる無機塩類を培地中に添加することが有効である。培地または培養液の水素イオン濃度をpH4～10、好ましくはpH5～9に調整して微生物を培養すると、ミオーアイノシトールを効率よくシローイノソースに変換することができる。

【0021】培養条件は、用いる培地の種類によって異なる。培養温度は12～35°C、好ましくは20～27°Cである。また、培養は液体培地を振盪したり、液体培地中に空気あるいは酸素ガスを吹き込むなどして好気的に行うのがよい。培養時間は、培養液中のミオーアイノシトールが完全に消失し、且つ、シローイノソースが最大の蓄積量を示すまで行えばよく、通常1～10日、好ましくは3～8日である。

【0022】培養後に、培養液(物)から菌体を除き、その培養上清液から目的物を採取する方法としては、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用

することができる。すなわち、培養液から菌体を除去した後、培養上清液を活性炭やイオン交換樹脂等で処理することにより、シローイノソース以外の不純物をほとんど除去くことができる。しかし、強塩基性陰イオン交換樹脂のOH<sup>-</sup>型はシローイノソースを化学変化させて、使用することはできない。かくして、シローイノソースを含有する上清液が得られる。その後、再結晶等の方法を用いることにより、目的物質を単離することができる。

【0023】より具体的には、シローイノソースが蓄積した培養上清液を、不純成分の除去の目的で強酸性陽イオン交換樹脂、例えはデュオライト(登録商標)C-20(H<sup>+</sup>型)の充填カラムを通過させて通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ、洗浄して洗浄液を集め、得られた通過液及び洗浄液を合併する。こうして合併された水溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂、例えはデュオライト(登録商標)A368S(遊離塩基型)を充填したカラムを通過させ、通過液を集め、その後このカラムに脱イオン水を通過させ、洗浄して洗浄液を集め、ここで得られた通過液及び洗浄液を合併して、シローイノソースを含みかつそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を取得するのが好ましい。この水溶液を濃縮して得られたシローイノソースの濃厚溶液に、エタノールの適量を加え、室温または低温で一晩放置すると、純粹なシローイノソースの結晶を晶出させることができる。

【0024】実施方法(B)では、AB10064株あるいはAB10253株を培養して得られた菌体を、あるいはその菌体の破碎物をミオーアイノシトールと緩衝液または液体培地中で反応させ、シローイノソースを生成させる。

【0025】菌体としては、実施方法(A)により得られた培養液から分離して集めた菌体を用いてもよく、また、前記微生物を別途、適当な培養条件で培養して得たものを用いてもよい。集菌すなわち、菌体の分離は、培養液から遠心分離、濾過等公知の方法により行えばよい。

【0026】得られた菌体または菌体破碎物をミオーアイノシトールと反応させる反応媒質としては、液体培地または緩衝液が用いられる。液体培地としては、実施方法

(A)で用いたものと同様のものを用いてもよく、あるいは、別途、上記微生物を培養した液体培地をそのまま用いてもよい。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド(Good's)のCHES緩衝液等を10～500mM、好ましくは20～100mMの濃度で用いればよい。溶液中のミオーアイノシトールの濃度は0.1～40%程度とするのが好ましい。

【0027】反応条件は、用いる菌株や培地、緩衝液の種類によって異なる。反応温度は5～60°C、好ましくは10～45°Cであり、反応時間は1～50時間、好ましくは12～36時間であり、液体培地または緩衝液のpHは2～10、好

ましくは3~9である。反応終了後の反応液からの目的物質を単離する方法は実施方法(A)と同様に行えばよい。

【0028】第2の本発明においては、第1の本発明の方法により培養液または水性媒質中でシローイノソースを生成させかつ蓄積させ、その生成されたシローイノソースを含む反応液または該水性媒質から、生成したシローイノソースを単離することなしに、該シローイノソースを含有する該反応液または水性媒質に適当な還元剤を添加して作用させ、シローイノソースを還元してシローイノシトールおよびミオーアイノシトールを生成させ、ついで、得られた還元反応液からシローイノシトールを回収することを特徴とする、シローイノシトールの製造方法が提供される。

【0029】第2の本発明方法は、具体的には以下に示す(C)、(D)の2つの実施方法で行うことができる。

【0030】実施方法(C)は、前記AB10064株あるいはAB10253株の細菌を、ミオーアイノシトールを含有する液体培地で培養し、培養液中でミオーアイノシトールに当該細菌を作用させて、ミオーアイノシトールをシローイノソースに変換することにより培養液中でシローイノソースを生成させかつ蓄積させ、ついで、得られた培養液から菌体を除去するがシローイノソースを単離することなしに、シローイノソースを含有する反応液(培養上清液)に還元剤を直接に添加して、該還元剤をシローイノソースに作用させてシローイノシトールおよびミオーアイノシトールを生成させ、そして、還元後の培養上清液(反応液)からシローイノシトールを回収する方法である。すなわち、実施方法(C)は、第1の本発明の実施方法

(A)により培養液中に生成させ、蓄積させたシローイノソースを、培養上清液から単離せずに、例えば水素化ホウ素アルカリ金属等の適当な還元剤で還元し、生成したシローイノシトール及びミオーアイノシトールの混合溶液から例えば活性炭処理、イオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せを行うことにより、シローイノシトールを回収する方法である。

【0031】実施方法(D)は、前記AB10064株あるいはAB10253株の細菌を、ミオーアイノシトールを含有する液体培地で培養し、得られた培養液から菌体を除去し、ここで得られた菌体あるいはその破碎物を、ミオーアイノシトールを含む水溶液または緩衝液中でミオーアイノシトールと反応させ、前記の水溶液または緩衝液中でシローイノソースを生成せしめ、ここで得た反応液中に生成したシローイノソースを単離すること無しに、シローイノソースを含有する該反応液に還元剤を直接に添加し、該還元剤をシローイノソースに作用させてシローイノシトールおよびミオーアイノシトールを生成させ、そして生成したシローイノシトールを回収する方法である。すなわち、実施方法(D)は、AB10064株あるいはAB10253株を使用して、第1の本発明の実施方法(B)により得られたシロ

イノソースを、単離せずに、例えば水素化ホウ素アルカリ金属等の適当な還元剤で還元し、シローイノソースから生成したシローイノシトール及びミオーアイノシトールの混合溶液から例えばイオン交換樹脂処理又は晶析操作又はこれらの組合せを行うことにより、シローイノシトールを回収する方法である。

【0032】以下においては、第2の本発明方法の実施方法(C)及び(D)をより詳しく説明する。

【0033】実施方法(C)では、前記第1の本発明の実施方法(A)の方法で培養液中にシローイノソースを生成させかつ蓄積させた後、培養液から菌体を除去するがシローイノソースを単離せず、培養上清液に適当な還元剤を添加し、還元反応を行う。こうして得られた還元反応液中から生成されたシローイノシトールを取得する。

すなわち、培養液から菌体を除去後、得られた培養上清液に直接に還元剤を添加して還元反応を行う。これによって、培養上清液内でシローイノソースからシローイノシトール及びミオーアイノシトールが生成される。使用される還元剤は、水系中でシローイノソースをシローイノシトールに還元できる還元剤であり、例えば、水素化ホウ素ナトリウム、水素化ホウ素リチウム、水素化ホウ素カリウム、水素化トリメトキシホウ素ナトリウム、シアノ化水素化ホウ素ナトリウムであるのが望ましい。ここで得られた還元反応液からシローイノシトールを回収し、採取するには、通常の水溶性中性物質を単離精製する一般的な方法を応用することができる。すなわち還元反応液を、活性炭やイオン交換樹脂で処理することにより、シローイノシトール及びミオーアイノシトールを含みそれ以外の不純物をほとんど含まない水溶液を得る。この水溶液からシローイノシトールだけを取得するには、主に水に対する溶解度の差を利用する効果がある。すなわち、前記の水溶液を濃縮し、水に対する溶解度の低いシローイノシトールを固体として析出せしめこれを取得すればよい。

【0034】実施方法(C)の改良方法として、以下に記す方法はシローイノシトールを効率良く取得するのにきわめて有効である。すなわち、シローイノソースを適当な還元剤で還元した溶液中ではシローイノシトールの他にミオーアイノシトールも生成されるが、この溶液に対して、遠心分離等で除いておいたAB10064株あるいはAB10253株の菌体を再び添加し、反復回で培養を行うことになり、シローイノシトールには何の変化を与えないに、ミオーアイノシトールをシローイノソースへ再度変換させ、培養液中にシローイノシトールとシローイノソースを蓄積させる。この際、ミオーアイノシトールの適量を追加添加したり、また炭素源や窒素源を培養開始前に添加しても良い。こうして得られた培養液から菌体を除いた後、培養上清液に再び還元剤を添加することによりシローイノソースを還元して、還元反応液中にシローイノシトールを多量に生成させ蓄積させることが可能であること

が、本発明者らによって初めて明らかになった。この様にして得られた反応溶液からシローイノシトールを単離し、精製するには、前記した通常の手法を用いて実施することができる。本発明の方法は、AB10064株あるいはAB10253株が基質としてミオーイノシトールを認識するがシローイノシトールは認識しないというAB10064株あるいはAB10253株の有するミオーイノシトール酸化酵素の基質特異性を利用したもので、繰り返し実施することで生成シローイノシトールの蓄積量を更に高めることが出来る。

【0035】実施方法(D)では、液体栄養培地に、前記AB10064株あるいはAB10253株の細菌を接種して好気的に培養することにより、該菌体を取得し、こうして得られた該菌体を、緩衝液あるいは液体培地等の水性媒質中に溶解させたミオーイノシトールに作用させて、シローイノソースを生成蓄積させ、シローイノソースを単離せず、適当な還元剤を添加し、還元反応を行い、こうして得られた還元反応液から、生成されたシローイノシトールを取得する。

【0036】この実施方法(D)で使用される菌体または菌体破碎物は、実施方法(B)と同様の手段で得ることができる。また、液体反応の方法も実施方法(B)と同様の手法で実施できる。シローイノソース含有反応液から遠心分離、沈過等の公知の手段により菌体を除去した後、得られた菌体を除去された反応液(培養上清液)に還元剤として水素化物を添加して、シローイノソース\*

(B) 生理生化学的性状

(1) グラム染色：

(2) OFテスト：

(3) 好気条件での生育：

(4) 嫌気条件での生育：

(5) 生育温度：

4°C

9°C

12°C

16°C

20°C

34°C

38°C

43°C

(6) 食塩耐性：

0%

2%

5%

10%

(7) 生育pH：

pH4.0

pH5.0

pH6.0

pH7.0

\*の還元反応を行い、これによりシローイノシトール及びミオーイノシトールを生成させる。この還元反応は、実施方法(C)で説明したと同じ要領で行い得る。更に、シローイノシトール及びミオーイノシトール含有の還元反応液からシローイノシトールを取得する方法は、先に実施方法(C)で説明した手法と同様に実施できる。

【0037】前述したようにミオーイノシトールからシローイノソース生産する菌は多種存在するが、例えば本発明者らが神奈川県厚木市の土壤より分離したAB10064株あるいはAB10253株は本発明に最も有効に使用される菌株の例である。本菌株の菌学的性質を以下に示した。

【0038】なお、本菌株の同定の当たっては、「新細菌培地学講座」(第2版、近代出版)、「医学細菌同定の手引き」(第2版、近代出版)、「細菌学実習提要」(丸善)に準じて実験を行い、実験結果を「Bergery's Manual of Systematic Bacteriology」VOL1(1984)を参考にして同定した。

【0039】AB10064株の菌学的諸性質を次に記載する。

20 (A) 形態的特徴

(1) 細胞形態：桿菌で大きさは $0.4 \sim 0.7 \times 0.6 \sim 4.0 \mu$ m。多形性がある。

【0040】(2) 運動性：+ (懸滴法)

(3) 普通寒天培地上での生育：生育は中程度。コロニー形態は円形、平滑で光沢を帯び、色調はクリーム色。

【0041】

-

O (Oxidative)

+

-

-

+

+

+

+

±

-

+

+

+

-

-

+

+

+

+

13

pH8.0	+
pH9.0	+
pH10.0	+

## (8) 色素の產生：

マンニット酵母エキス寒天培地(不溶性色素の検出)

なし

King培地B(水溶性色素の検出)

淡黄色の螢光色素を產生する

(9) チトクロームオキシダーゼ：	+
(10) カタラーゼ：	+
(11) 硝酸塩還元性：	-
(12) 硫化水素產生：	-
(13) ゼラチンの液化：	-
(14) インドールの產生：	-
(15) マロン酸の利用性：	+
(16) ONPG分解性：	-
(17) エスクリンの分解性：	-
(18) クエン酸の利用性：	+
(19) デカルボキシラーゼ活性：	
L-リジン	-
L-アルギニン	+
L-オルニチン	-
(20) 尿素の分解性：	+
(21) アセトアミド分解性：	-
(22) 各種糖から酸の生成：	
D-グルコース	+
D-キシロース	+
D-マンノース	+
L-アラビノース	+
D-フルクトース	-
マルトース	-
L-ラムノース	-
マンニトール	-
シュークロース	-
アドニトール	-
ミオ-イノシトール	-
グルビトール	-
トレハロース	-
D-セロビオース	-
ズルシトール	-
グリセロール	+
ラクトース	-
メリビオース	+
ラフィノース	-
$\alpha$ -メチル-グルコース	-
サリシン	-
(23) 炭素源の資化性	
D-グルコース	+
D-フルクトース	+
L-アラビノース	+

15

D-キシロース	+
グリセロール	+
エタノール	+
ポリエチレングリコール	+
L-ヒスチジン	+
L-バリン	+
L-アルギニン	+
L-セリン	+
(24) V-Pテスト	-
(25) フェニルアラニンデアミナーゼ	-
(26) トリプトファンデアミナーゼ	-
(27) ユピキノンの分子種：	ユピキノン9 (Q9)
(28) DNAのGC含量：	62%

【0042】以上のとおり、AB10064株の主性状は、グラム陰性の桿菌で、大きさは $0.4\sim0.7\times0.6\sim4.0\mu\text{m}$ である。本菌株は生育適温 $12^\circ\text{C}\sim34^\circ\text{C}$ の中温菌でpH4.0では生育しない。硝酸塩の還元性はなく、カタラーゼ及びオキシダーゼ陽性であり、グルコースを好気的に分解し、酸を生成する。ユピキノンの分子種はQ9で、DNAのG C含量は62%であった。

【0043】これらの菌学的性質を総合して、本菌株はシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する菌株であると判断した。「Bergery's Manual of Systematic Bacteriology」 Vol 1 (1984) 第141頁～第199頁によると、シュードモナス属細菌は30種以上の種 (species) が知られており、遺伝子的に幅のある分類群を形成している。

【0044】AB10064株の菌学的性状を上記の既知の種と比較検討した結果、AB10064株はシュードモナス・ブチダ (Pseudomonas putida) に最も近縁の種であると考えられた。しかし、本菌株の菌学的性質は炭素源の資化性等の結果が、シュードモナス・ブチダの性状と完全には一致しなかったので、本AB10064株を公知のものと区別するため、シュードモナス・エスピーアB10064株と命名し、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18330として寄託した（寄託日は平成13年5月17日）。

\*

## (b) 生理生化学的性状

(1) グラム染色：	- (一部variable)
(2) OFテスト：	O (Oxidative)
(3) 好気条件での生育：	+
(4) 嫌気条件での生育：	-
(5) 生育温度：	
10°C	-
12°C	±
15°C	+
35°C	+
38°C	+
42°C	±
(6) 食塩耐性：	
0%	+

16

\* 【0045】シュードモナス属細菌では、シュードモナス・ブチダ (Pseudomonas putida) 及びシュードモナス・ベイシェリンキー (Pseudomonas beijerinckii) において、ミオ-イノシトールをシロ-イノソースへ酸化する活性を有していることが知られている。シュードモナス・ブチダの活性は文献によると、シロ-イノシトールをミオ-イノシトールの2倍の比率で酸化するという点で、AB10064株とは異なっている。また、同じくシュードモナス・ベイシェリンキーも同様な活性が報告されているが、AB10064株は前記した通りシュードモナス・ブチダに近縁な細菌であり、シュードモナス・ベイシェリンキーとは菌学的性質が大きく異なる。従って本発明で用いるシュードモナス・エスピーアB10064株の有するミオ-イノシトール酸化活性は全くの新知見であるといえる。

【0046】AB10253株の菌学的性質を次に記載する。  
 30 (a) 形態的特徴  
 (1) 細胞形態：球桿菌で大きさは $0.5\sim0.8\times0.6\sim16\mu\text{m}$ 。多形性は無い  
 (2) 運動性：- (懸滴法)  
 (3) 普通寒天培地上での生育：生育は極微。色調は黄土色～黄色

(10)

17

1%

+

2%

-

## (7) グルコース耐性：

10%

+

20%

+

30%

+

## (8) エタノール耐性試験：

1%

+

2%

+

5%

+

10%

+

## (9) 生育pH：

pH3.0

-

pH4.0

+

pH5.0

+

pH7.0

+

pH8.0

±

## (10) 色素の產生：

GYC培地 菌体周囲が黄土色～茶色に着色

(11) チトクロームオキシダーゼ： -

(12) カタラーゼ： +

(13) 硝酸塩還元性： -

(14) 硫化水素產生： -

(15) ゼラチンの液化： -

(16) インドールの產生： -

(17) マロン酸の利用性： -

(18) ONPG分解性： -

(19) エスクリンの分解性： +

(20) クエン酸の利用性： -

(21) アルギニンヒロラーゼ活性： -

(22) 尿素の分解性： -

(23) デオキシリボヌクレアーゼ活性： +

## (24) 各種糖から酸の生成：

D-グルコース

+

D-キシロース

+

D-マンノース

+

L-アラビノース

+

D-フルクトース

-

ガラクトース

+

L-ラムノース

-

マンニトール

-

シュークロース

-

アドニトール

-

エリスリトール

-

アラビトール

-

ミオ-イノシトール

+

ソルビトール

-

トレハロース

-

D-セロビオース

-

エタノール

+

19

20

グリセロール	+
ラクトース	-
リボース	+
ラフィノース	-
プロピレンギリコール	-
$\beta$ -ヒドロキシープチレート	-
$\alpha$ -メチルグルコース	-

(25) 炭素源の資化性	
D-グルコース	+
ガラクトース	-
L-アラビノース	-
D-キシロース	-
グリセロール	+
ミオ-イノシトール	+
シュークロース	-
L-ヒスチジン	-
レバリン	-
L-アルギニン	-
L-セリン	-

(26) ユビキノンの分子種：	
(27) DNAのCC含量：	ユビキノン9 (Q9)

58%

【0047】以上のとおり、AB10253株の主性状は、グラム陰性の球桿菌で、大きさは0.5~0.8×0.6~1.6μm。生育適温は30°C~34°Cの中温菌で至適生育pHはpH5。硝酸塩の還元性は無く、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性であり、30%グルコース培地で好気的に生育する。ユビキノンの分子種はQ9で、DNAのCC含量は58%であった。

【0048】これらの菌学的性質を総合して、本菌株はアセトバクター (Acetobacter) 属に属する菌株であると判断した。Bergery's Manual of Systematic Bacteriology VOL.1 (1984) 268頁~274頁によると、アセトバクター属はアセトバクター・アセティ (Acetobacter aceti)、アセトバクター・リケファシエンス (Acetobacter liquefaciens)、アセトバクター・パステウリアヌス (Acetocacter pasteurianus)、アセトバクター・ハンセンニー (Acetobacter hansenii) の4つの種 (species) から構成されている。AB10253株の菌学的性状を上記の既知の種と比較検討した結果、AB10253株はアセトバクター・アセティ (Acetobacter aceti) に最も近縁の種であると考えられた。しかし、高濃度のグルコース及びエタノールに対して耐性である点、生育温度において38°Cでも生育する点、可溶性色素を産生する点など本菌株の有するいくつかの菌学的性質において、アセトバクター・アセティの性状とは一致しなかったので、本AB10253株を公知のものと区別するため、アセトバクター・エスピーアB10253株と命名し、産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18868として寄託した（寄託日は平成14年5月27日）。

【0049】本明細書で先に記したように、1960年代ま

ではアセトバクター属細菌とグルコノバクター属細菌は分類学的な境界が曖昧であり、本来はグルコノバクター属である微生物がアセトバクター属と同定され発表されていた。従ってアセトバクター属細菌によるミオ-イノシトール酸化活性は、本発明で開示したAB10253株が初めての発見である。

#### 【0050】

【発明の効果】本発明の方法によれば、医農薬合成原料として有用な、純度の高いシローイノソースと、医薬及び医農薬合成原料として有用なシローイノシトールとを工業的生産レベルで安価に製造することができる。

#### 【0051】

【発明の実施の形態】以下に本発明の実施例を説明する。

#### 実施例1

##### 実施方法(A)によるシローイノソースの製造例

###### (1) シローイノソースの生成

ミオ-イノシトール12.0%、酵母エキス1.0%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S 0.1%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%を含む液体培地3リットルを、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。滅菌された液体培地を含む各々の三角フラスコにシードモナス・エスピーアB10064株 (FERM P-18330) のスラント培養物を1白金耳接種し、27°Cで4日間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離(8,000rpm 20分間)し、上清を培養上清液(2900ml)として得た。

【0052】この培養上清液を高速液体クロマトグラフィーにより下記の条件で分析した。その結果、培養上清液中にはシローイノソースが98mg/mlの濃度で生成して

21

いることがわかった（収量284g、ミオーアイノシトールからの変換率80%）。この時の培養液中にミオーアイノシトールは検出されなかった。

【0053】高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下の通りである。

カラム：Wakosil 5NH<sub>2</sub> (4.6×250mm)

カラム温度：40°C

検出器：RIDETECTOR ERC-7515A (ERMA CR. INC.)

注入量：20μl

溶媒：アセトニトリル-水=4:1

流量：2 ml/min

溶出時間シローイノソース：11.6分

なお、上記のシローイノソースの変換率は、次式により求めた。

変換率（%）=〔培養上清液中のシローイノソースのモル数÷培地中のミオーアイノシトールのモル数〕×100

【0054】(2)シローイノソースの単離

実施例1(1)で得た培養上清液を、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）C-20 (H型) 500mlを充填したカラム（内径5cm、長さ40cm）を通過させ、その後、このカラムに500mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。ここで得られたカラム通過液及び洗浄液を合併し、合併した水溶液を弱塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト（登録商標）368S（遊離塩基型）1000mlを充填したカラム（内径7cm、長さ40cm）を通過させ、その後、このカラムに1000mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併した水溶液中には上記シローイノソースが含まれ、それ以外の不純物はほとんど存在していなかった。

【0055】上記により得たシローイノソース水溶液を減圧下で約700mlまで濃縮し、エタノールを3倍量加え5°Cで一晩放置したところ、純粋なシローイノソースの精製品の無色結晶216gが得られた。この時の精製回収率は76%で、ミオーアイノシトールからのシローイノソースの通算収率は61%であった。

【0056】なお、上記シローイノソースの精製回収率は次式により求めた：

精製回収率（%）=〔精製単離したシローイノソースの量÷培養上清液中の精製前のシローイノソースの量〕×100

また、上記シローイノソースの全回収率は次式により求めた：

全回収率（%）=〔精製単離したシローイノソースのモル数÷培地中に添加したミオーアイノシトールのモル数〕×100

【0057】実施例2

実施方法(B)によるシローイノソースの製造例

(1) 菌体の生産

ミオーアイノシトール 0.5%、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01%を含むpH7の

22

液体培地2リットルを500ml容のバッフル付き三角フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブ滅菌した。滅菌された液体培地を含む各々の三角フラスコにシュードモノス・エスピーアB10064株を接種し、27°Cで3日間振盪培養した。培養液を遠心分離して得られた菌体を、0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0) 200mlで洗浄後、再度遠心分離し、洗浄菌体を得た。

【0058】(2)シローイノソースの製造

上記により得られた洗浄菌体30gを、溶解されたミオーアイノシトール 4.0gを含有した0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0) 400ml（ミオーアイノシトール濃度10mg/ml）中に加え、得られた混合物を30°Cで、24時間、緩やかにスタークで攪拌しながら菌体をミオーアイノシトールに作用させて反応させた。反応終了後、得られた反応液から菌体を除き、その反応液濾液を液体クロマトグラフィーにより分析したところ、シローイノソースが8mg/mlの濃度（変換率82%）で蓄積していた。反応液濾液からのシローイノソースの回収と単離は、実施例1に記載した方法に準じて行い、シローイノソース2.5gを結晶として得た（精製回収率78%）。また、上記シローイノソースのミオーアイノシトールからの全回収率は64%であった。

【0059】なお、上記のシローイノソースの変換率は、実施例1に準じて求め、精製回収率は次式により求めた：

精製回収率（%）=〔精製単離したシローイノソースの量÷反応液中の精製前のシローイノソースの量〕×100  
また、上記シローイノソースのミオーアイノシトールからの全回収率は次式により求めた：

全回収率（%）=〔精製単離したシローイノソースのモル数÷緩衝液中に添加したミオーアイノシトールのモル数〕×100

【0060】実施例3

実施方法(C)によるシローイノシトールの製造例の1

(1)シローイノソースの生成

実施例1の(1)と全く同様の方法でAB10064株を3リットルの培地で培養し、培養液を遠心分離して菌体を除去した。シローイノソースを含有した培養上清液2900mlを得た。この培養上清液を実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析すると、培養上清液中にはシローイノソースが286g（ミオーアイノシトールからシローイノソースへの変換率は80%）生成していることがわかった。

【0061】変換率（%）=〔培養上清液中のシローイノソースのモル数÷培地中のミオーアイノシトールのモル数〕×100

【0062】(2)シローイノソースの還元とシローイノシトールの生成

前項(1)で得たシローイノソース含有培養上清液の2900mlに水素化ホウ素ナトリウム 15.3gを徐々に加え、還元反応を実施した。還元終了後、培養上清液（すなわち

還元反応液)を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、その還元反応液(培養上清液)中には、シローイノシトールが105g存在し、副生成物として、ミオーイノシトールを151g含有していることがわかった(シローイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率は89%:計算式は下記に示す)。シローイノソースからのシローイノシトールの反応収率は36%であった。なお、高速液体クロマトグラフィーにおける、各化合物の溶出時間は以下の通りである。

溶出時間:ミオーイノシトール 17.0分、シローイノシトール 17.7分

【0063】シローイノシトールとミオーイノシトールの合計反応収率(%) = [還元反応後の培養上清液中のシローイノシトールのモル数とミオーイノシトールのモル数の合計 ÷ 還元反応前の培養上清液中のシローイノソースのモル数] × 100

【0064】また、上記のシローイノソースからのシローイノシトールの反応収率は次式により求めた:

反応収率(%) = [還元反応後の培養上清液中のシローイノシトールのモル数 ÷ 還元反応前の培養上清液中のシローイノソースのモル数] × 100

【0065】(3) シローイノシトールの単離

前項(2)で得た還元反応液を強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H<sup>+</sup>型)400mlを充填したカラム(内径5cm、長さ40cm)に通過させ、その後、このカラムに400mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。ここで得られたカラム通過液及び洗浄液を合併し、合併した水溶液を強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH<sup>-</sup>型)800mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)を通過させ、その後、このカラムに800mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。

【0066】こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液は、シローイノシトールと副生成物であるミオーイノシトールを含有するが、これら以外の不純物をほとんど含有しなかった。この水溶液を減圧下で濃縮すると、水溶解度の低いシローイノシトールのみが濃縮液中に析出した。500mlまで濃縮し、析出した結晶を濾過操作により取得した。このようにして得られた結晶(79g)の一部を水に溶解して、実施例1に記した方法による液体クロマトグラフィー及び他の分析装置で分析すると、この結晶はミオーイノシトールを僅かに含有するシローイノシトールの結晶であることが判った。続いて、この結晶を全て4リットルの水に溶解し、グラスフィルターで濾過した後、再度400mlまで濃縮した。ここで析出した結晶を取得し、60gの白色結晶を得た。この結晶を液体クロマトグラフィー及びその他の分析装置で分析すると純粋なシローイノシトールであることが判明した。

【0067】以上の一連の操作での、シローイノシトール

の精製回収率は57%、ミオーイノシトールからのシローイノシトールの全収率は17%であった。

【0068】なお、上記シローイノシトールの精製回収率は次式により求めた:

精製回収率(%) = [結晶として単離したシローイノシトールの量 ÷ 還元反応後の上清液中のシローイノシトールの量] × 100

また、上記シローイノシトールのミオーイノシトールからの全回収率は次式により求めた:

10 全回収率(%) = [結晶として単離したシローイノシトールの量 ÷ 培地中に添加したミオーイノシトールの量] × 100

#### 【0069】実施例4

##### 実施方法(c)によるシローイノシトールの製造例の2

###### (1) シローイノソースの生成と還元

実施例3の(1)と全く同様の方法でAB10064株を培養した。培養上清液中に生成したシローイノソースを実施例3の(2)と同様の方法で還元し、シローイノシトール(105g)とミオーイノシトール(152g)を含有する混合溶液(2900ml)を得た。この溶液に、遠心分離により分取されたAB10064株の菌体と酵母エキス(6g)を添加した。得られた混合溶液を5L容ジャーファーメンターに投入して、培養温度27°C、攪拌回転数400rpm、通気量1v/vで3日間培養を行った。培養液を分析した結果、前記混合溶液中のミオーイノシトールはシローイノソースに変換されていた。かくしてシローイノソース(122g)及びシローイノシトール(105g)と菌体を含有する混合溶液を得た。

30 【0070】この混合溶液から菌体を遠心分離により除き、得られた溶液(培養上清液)に水素化ホウ素ナトリウム6.5gを徐々に加えて還元反応を実施した。その結果、還元反応後の反応溶液(培養上清液)中にはシローイノシトールが162g存在し、更に副生物として、ミオーイノシトールが66g含有されていることがわかった。最終的にミオーイノシトールからのシローイノシトール変換率は45%であった。

###### (2) シローイノシトールの単離

実施例3の(3)と同じ手法で還元反応液からシローイノシトールの単離を行った。即ちイオン交換樹脂による脱

40 塩の後、溶液を約900mlに濃縮し、シローイノシトールの結晶を析出させ、この結晶を濾過することにより単離した。こうして取得したシローイノシトールの粗結晶を再度8リットルの水に溶解し、得られた水溶液からグラスフィルターで水不溶物を除去し、ついで減圧下濃縮した。水溶液を約800mlに濃縮した後、析出したシローイノシトールをグラスフィルターで濾過し、白色結晶(12.3g)として回収した。ミオーイノシトールからの全回収率は34%であった。

全回収率(%) = [結晶として単離したシローイノシトールの量 ÷ 培地中に添加したミオーイノシトールの量]

×100

## 【0072】実施例5

## 実施方法 (c) によるシローイノシトールの製造例の3

## (1) シローイノソースの生成と還元

実施例4の(1)と全く同様の方法でAB10064株の培養、培養上清液の還元、還元反応液の再培養及び2度目の培養上清液の再還元を実施した。こうして得られた還元反応後の反応溶液(培養上清液)にはシローイノシトールが160g存在し、副生物として、ミオーアイノシトール65gが含有されていた。この混合溶液に再度、遠心分離して分取されておいたAB10064株の菌体と酵母エキス(2.5g)を添加した。得られた混合液を5L容ジャーファーメンターに装入し、培養温度27°C、攪拌回転数400rpm、通気量1vvmで3日間培養を行った。培養液を分析した結果、前記混合液中のミオーアイノシトールはシローイノソースに変換されていた。かくして、シローイノソース(52g)及びシローイノシトール(160g)と菌体を含有する混合溶液を得た。

【0073】この混合溶液から菌体を遠心分離により除き、得られた上清溶液に水素化ホウ素ナトリウム2.8gを徐々に加えて還元反応を実施した。還元反応後の反応溶液(培養上清液)にはシローイノシトールが180g存在し、副生物として、ミオーアイノシトール26gが含有されていることがわかった。最終的にミオーアイノシトールからのシローイノシトール変換率は50%であった。

## 【0074】(2) シローイノシトールの単離

実施例4の(2)と同じ手法でシローイノシトールの単離を行った。即ちイオン交換樹脂による脱塩の後、溶液を約900mlに濃縮し、シローイノシトールの結晶を析出させ、この結晶を濾過することにより単離した。こうして取得したシローイノシトールの粗結晶を再度8リットルの水に溶解し、得られた溶液を減圧下で濃縮した。約800mlに濃縮し、その結果析出したシローイノシトールをグラスフィルターで濾過し、白色結晶(140g)として得た。ミオーアイノシトールからの全回収率は39%であった。

## 【0075】実施例6

## 実施方法 (d) によるシローイノシトールの製造例

実施例2と全く同様の方法で、AB10064株の洗浄菌体によるミオーアイノシトールの酸化でシローイノソースの製造を行った。すなわちミオーアイノシトール4.0gを含有する0.05Mリン酸緩衝液(pH7.0)400ml(ミオーアイノシトール濃度10mg/ml)中にAB10064株の洗浄菌体30g加え、得られた混合物を30°Cで24時間緩やかにスターーラーで攪拌しながら菌体をミオーアイノシトールと反応させて、反応溶液中にシローイノソースを8mg/mlの濃度で蓄積させた。反応液を遠心分離して菌体を除き、得られた溶液(上清液)に水素化ホウ素ナトリウム170mgを徐々に加えて還元反応を実施した。その結果、反応液中にはシローイノシトールが1250mg存在し、副生物としてミオーアイ

10

ノシトール1600mgが含有されていた。

【0076】実施例3の(3)と同様の手法でシローイノシトールの単離を行い、シローイノシトールの白色結晶800mgを得た。ミオーアイノシトールからの全回収率は20%であった。

## 【0077】実施例7

## 実施方法 (c) によるシローイノシトールの製造例の4

## (1) シローイノソースの生成

ミオーアイノシトール 16.0%、酵母エキス 16%を含む液体培地3リットルをpH5.0に調整し、100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注し、オートクレーブ滅菌した。各々の三角フラスコにアセトバクター・エスピーAB10253株(FERM P-18868)のスラント培養物を1白金耳接種し、27°Cで4日間振盪培養した。培養液を遠心分離(8,000rpm 20分間)して菌体を除き、上清を培養上清液(2900ml)とした。遠心分離により得られた培養菌体は4°Cで冷蔵保存した。この培養上清液を実施例1と同様の方法で分析した。その結果培養上清液中にはシローイノソースが153mg/ml(459g、変換率97%)生成していることがわかった。この時の培養液中にミオーアイノシトールは検出されなかった。

## 【0078】(2) 培養上清液の還元

前項(1)で得たシローイノソース含有の培養上清液の2900mlに水素化ホウ素ナトリウム30.6gを徐々に加え、還元反応を実施した。還元終了後、培養上清(反応液)を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、還元反応後の反応液中(培養上清液)には、シローイノシトールが177g存在し、副生成物として、ミオーアイノシトールを252g含有していることがわかった。

## 【0079】(3) シローイノシトール粗結晶の単離と、菌体反応によるシローイノソースの生成

前項(2)で得た還元反応後の反応液を一晩、室温に静置して置くとシローイノシトールを含有する白色の沈殿物が生じた。この溶液をろ過し、白色固体と、ろ液に分けた。白色固体は乾燥重量で99g得られた。ろ液は再度反応させるためにミオーアイノシトールの228gを追加し溶解させた後に、5N HClでpH5.0に調整した。これに前項(1)で分離されて保存しておいた培養菌体を懸濁し、約100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注した。

【0080】菌体反応は純酸素ガスを三角フラスコ内の混合液に通気し、27°Cで20時間、ロータリーシェーカーで反応させた。反応終了後、反応溶液を遠心分離(8,000rpm 20分間)し、上清を菌体反応上清液(3050ml)とした。遠心分離により得られた培養菌体は4°Cで冷蔵保存した。

## 【0081】(4) 菌体反応上清液の還元

前項(3)で得たシローイノソース含有の培養上清液の3050mlに水素化ホウ素ナトリウム31.1gを徐々に加え、

20

30

40

50

に還元反応を実施した。還元終了後、菌体反応上清液(還元反応液)を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、還元反応後の反応液中には、シローイノシトールが258g存在し、副生成物として、ミオーイノシトールを256g含有していることがわかった。

【0082】(5) シローイノシトール粗結晶の単離と菌体再反応によるシローイノソースの生成

前記(4)で得た還元反応後の反応液を一晩、室温に静置して置くとシローイノシトールを含有する白色の沈殿物が生じた。この溶液をろ過し、白色固体と、ろ液に分けた。白色固体は乾燥重量で199g得られた。ろ液は再度反応させるためにミオーイノシトールの224gを追加し溶解させた後に、5N HClでpH5.0に調整した。これに前項(3)で分離され保存しておいた培養菌体を懸濁し、約100mlずつ500ml容のバッフル付き三角フラスコに分注した。菌体反応は純酸素ガスを三角フラスコ内の混合液に通気し、27°Cで20時間、ロータリーシェーカーで反応させた。菌体との再反応終了後、生成したシローイノソースを含有した培養液を遠心分離(8,000rpm 20分間)して菌体を除去し、上清を菌体再反応後の培養上清液(3170ml)とした。遠心分離により得られた培養菌体は4°Cで冷蔵保存した。

【0083】(6) 菌体反応後の培養上清液の還元  
前項(5)で得たシローイノソース含有の培養上清液の3170mlに水素化ホウ素ナトリウム31.1gを徐々に加えた後に還元反応を実施した。還元終了後、ここで得た還元反応液を、実施例1で示した高速液体クロマトグラフィーにより分析した。その結果、還元反応液中(培養上清液)には、シローイノシトールが268g存在し、副生成物として、ミオーイノシトールを253g含有していることがわかった。

【0084】(7) シローイノシトール粗結晶の単離 \*

\* 前項(6)で得た還元反応液を一晩、室温に静置して置くとシローイノシトールを含有する白色の沈殿物が生じた。この溶液をろ過し、白色固体と、ろ液に分けた。白色固体は乾燥重量で197g得られた。この白色沈殿物と、前項(3)と(5)で得られた白色沈殿物を合わせて、シローイノシトールを含有する白色沈殿物を合計495g(99+199+197)得た。また、ここまで反応に要したミオーイノシトールは932g(480+228+224)であった。

【0085】(8) シローイノシトールの精製と単離  
これまでに得られた白色沈殿物487gを熱水25Lに溶解させた後、室温まで冷却し、強酸性陽イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)C-20(H<sup>+</sup>型)400mlを充填したカラム(内径5cm、長さ40cm)に通過させ、その後このカラムに400mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。この通過液及び洗浄液を、強塩基性陰イオン交換樹脂デュオライト(登録商標)A-113(OH<sup>-</sup>型)800mlを充填したカラム(内径5cm、長さ60cm)に通過させ、その後このカラムに800mlのイオン交換水を通過させて洗浄した。

【0086】こうして得られた通過液及び水洗浄液を合併して得られた水溶液は、シローイノシトールと副生成物であるミオーイノシトールを含有するが、これら以外の不純物をほとんど含有しなかった。この水溶液を減圧下で濃縮すると、水溶解度の低いシローイノシトールのみが濃縮液中に析出した。500mlまで濃縮し、析出した結晶を濾過操作により取得した。このようにして得られた結晶(421g)の一部を水に溶解して実施例1に記した方法による液体クロマトグラフィー及び他の分析装置で分析すると、ミオーイノシトールを含有しない純粋なシローイノシトールの結晶であった。以上の一連の操作での、ミオーイノシトールからのシローイノシトールの全収率は45%(421/932×100)であった。

### フロントページの続き

(51) Int.Cl. \*  
//(C 12 N 1/20  
C 12 R 1:38)  
(C 12 N 1/20  
C 12 R 1:02)  
(C 12 P 7/18  
C 12 R 1:38)  
(C 12 P 7/18  
C 12 R 1:02)  
(C 12 P 7/26  
C 12 R 1:38)  
(C 12 P 7/26  
C 12 R 1:02)

### 識別記号

F I  
C 12 R 1:38  
1:02

マーク(参考)

(72)発明者 北 雄一  
神奈川県厚木市戸田2385番地 北興化学厚  
木寮  
(72)発明者 山口 将憲  
神奈川県座間市立野台1丁目4番6号 サ  
ンライズ立野台101  
(72)発明者 玉村 健  
神奈川県大和市中央林間5丁目18番4号

(72)発明者 森 哲也  
神奈川県高座郡寒川町倉見3830-6 シテ  
ィクラミ311号室  
F ターム(参考) 4B064 AC05 AC31 CA02 CB13 CB18  
CC03 CD02 CD10 DA01  
4B065 AA02X AA41X AC14 BB06  
BD22 CA07 CA09 CA44  
4H006 AA02 AC41 BE23 FC22 FE12